

**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKSAMKEIT
EINER KOMBINIERTEN GASBRAND-TETANUS-IMPFGUNG BEI
DER MAUS**

David Piendl

1900

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. DDr. h.c. Anton Mayr

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKSAMKEIT
EINER KOMBINIERTEN GASBRAND-TETANUS-IMPfung BEI
DER MAUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von
David Piendl
aus
Augsburg
München 1980

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. v. Sandersleben

Referent: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. H. K. Dennig

Tag der Promotion: 25. Juli 1980



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	2
2.1. <u>Vorkommen und Verbreitung von Clostridien</u>	2
2.2. <u>Clostridien-Toxine</u>	4
2.3. <u>Bedeutung der Clostridien als Krankheits-</u> <u>erreger</u>	7
2.4. <u>Kombinationsimpfung gegen Clostridien-</u> <u>Toxine</u>	8
2.4.1. Begriffsbestimmung	8
2.4.2. Kombinationsimpfstoffe gegen C.-Toxine	9
2.4.3. Applikation	13
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	19
3.1. <u>Material und Methoden</u>	19
3.1.1. Versuchstiere	19
3.1.2. Impfstoffe	19
3.1.3. Immunisierung	20
3.1.4. Aktiver Mäuseschutzversuch	20
3.1.5. Auswertung der Schutzversuche	20
3.1.6. Neutralisationsversuch	21
3.1.7. Indirekte Hämagglutination	21
3.1.7.1. Immunserumherstellung	21
3.1.7.2. Gewinnung der Mäuseseren	21
3.1.7.3. Behandlung der Seren	22
3.1.7.4. Antigene	22

	Seite
3.1.7.5. Erythrozyten	22
3.1.7.6. Durchführung des Testes	23
3.2. <u>Ergebnisse</u>	24
3.2.1. Prüfung auf Unschädlichkeit	24
3.2.2. Prüfung auf Wirksamkeit	24
4. DISKUSSION	34
5. ZUSAMMENFASSUNG	38
6. LITERATURVERZEICHNIS	41

1. EINLEITUNG

Die Zahl der Impfungen nimmt in der Human- wie Tiermedizin immer mehr zu. Dadurch wird es immer schwieriger, die einzelnen Impfungen in einem Impfkalender unterzubringen. Als Ausweg bieten sich Kombinationsvakzinen an, die ohne lange Wartezeit einen kompletten Schutz gegen mehrere Erreger gleichzeitig ermöglichen. Kombinationsvakzinen gegen Clostridien fanden schon immer besondere Beachtung. Die Erreger von Gasbrand, Tetanus, Rauschbrand und Botulismus stellen durch die weltweite Verbreitung ihrer Sporen eine ständige Bedrohung für Mensch und Tier dar. Diese Gefahr könnte mit einer Clostridien-Kombinationsvakzine gebannt werden. In der Vergangenheit wurden auch schon zahlreiche Versuche unternommen, Kombinationsvakzinen gegen mehrere Clostridien-Toxine zu entwickeln. Die bisherigen Vakzinen befriedigten aber letztlich noch nicht. Vor allem fehlten bisher Untersuchungen mit Kombinationsvakzinen, die sowohl Toxoide der klassischen Gasbranderreger (*C. perfringens* Typ A, *C. novyi* Typ A) als auch des Tetanuserregers (*C. tetani*) enthielten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit der monovalenten Clostridien-Toxoidimpfstoffe *C. novyi* Typ A, *C. tetani* und *C. perfringens* Typ A bei der Maus experimentell untersucht und mit der Wirkung eines Kombinationsimpfstoffes mit zwei oder drei dieser Toxoide verglichen. Dabei sollte im einzelnen untersucht werden, ob eine Kombination dieser Clostridien-Toxoide grundsätzlich möglich ist, ob Dosierungsunterschiede zwischen Einfach- und Mehrfachimpfstoffen gegeben sind und ob bei Mehrfachimpfstoffen Unverträglichkeitsreaktionen auftreten.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Vorkommen und Verbreitung von Clostridien

Bakterien der Gattung *Clostridium* (C.) sind weltweit verbreitet. Besonders in Ländern mit großen Schafzuchtgebieten (England, Australien, Neuseeland, Nord- und Südamerika, Asien) werden sie häufig isoliert. Untersuchungen über die Verbreitung der Clostridien konzentrierten sich vor allem auf die pathogenen Vertreter: *C. tetani*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. botulinum* (Nishida et al. 1964, Jamagishi et al. 1964). Aus 193 Erdproben, die von europäischen Kriegsschauplätzen in Belgien, Nord- und Ostfrankreich, in baltischen Ländern, Polen, Rumänien und Nordbalkan stammten, wurden in 27% der Proben *C. tetani*, in 100% *C. perfringens*, in 64% *C. septicum* und in 2% *C. histolyticum* isoliert (Klose et al. 1970). Aus 104 Bodenproben von 11 Schafweiden in Wales, in denen häufig Tiere an nekrotischer Hepatitis (*C. novyi*) erkrankten, ließen sich in 13,9% der Proben *C. novyi* Typ B isolieren. Bodenproben aus Farmen, die nicht verseucht waren, waren nur zu 7,3% mit *C. novyi* kontaminiert (Williams 1976).

Neben dem Vorkommen im Boden sind diese Keime auch im Darmtrakt und in Organen gesunder Tiere nachgewiesen worden. Als Erster zeigte Edgar schon 1928 die Anwesenheit von *C. novyi* in den Lebern gesunder Schafe. Williams (1976) wies in 23,4% von 291 untersuchten Lebern von gesunden Schafen *C. novyi* nach. In Kotproben von 150 gesunden Schafen, die in verschiedenen Schlachthöfen Ägyptens geschlachtet wurden, stellten Ghoniem et al. (1972) bei 32% der Tiere Clostridien fest, wobei *C. perfringens* nur mit 2% vertreten war, während *C. sporogenes* in 15,33%, *C. nigrificans* in 6,66%, *C. tertium* in 4,66%, *C. tetani*

in 3,33% der Fälle isoliert wurden.

Shinjo et al. (1965) isolierten aus 180 Kotproben von Fleischfressern (Schwarzer Leopard, Leopard, Tiger, Gepard, Puma und Jaguar) folgende 174 Clostridien-Stämme: *C. perfringens* (73mal), *C. butyricum* (7mal), *C. septicum* (2mal), *C. sphenoides* (2mal), *C. botulinum* (1mal), *C. bifementans* (1mal), *C. sporogenes* (13mal), *C. perenne* (6mal), *C. multifementans* (2mal), *C. novyi* (1mal), *C. tetanomorphum* (1mal), *C. fallax* (1mal) sowie 64 nicht identifizierbare Stämme.

In einer weiteren Versuchsreihe untersuchten Sinha et al. (1975) 221 Kotproben, die aus dem Enddarm von Pferden, Schweinen, Rindern, Hühnern, Hunden und Katzen entnommen wurden, auf ihren Gehalt an *C. perfringens*. Bei 30 Pferden isolierten sie 3 *C. perfringens* Typ A-Stämme (Keimzahl: 10^1 /g Kot). Von den 3 Stämmen waren 2 toxisch und einer nicht toxisch. 27% der Rinder hatten 20 *C. perfringens*-Stämme (Keimgehalt von 10^1 - 10^2 /g Kot), von denen 19 Stämme dem Typ A (12 toxisch, 7 nicht toxisch) und 1 Stamm dem Typ D angehörte. Bei 54% der Schweine fanden sie 27 *C. perfringens*-Stämme (Keimgehalt von 10^1 - 10^3 /g Kot). 25 Stämme waren vom Typ A (20 toxisch und 5 nicht toxisch) und 2 Stämme vom Typ C. 59% der Hunde und 70% der Katzen hatten zumeist toxische *C. perfringens*-Stämme vom Typ A im Kot (Keimgehalt von 10^4 - 10^6 /g Kot). Bei 58% der Hühner waren 26 Stämme vom Typ A, 2 Stämme vom Typ D und 1 Stamm vom Typ C (Keimzahl 10^2 - 10^3 /g Kot). 22 der Typ A Stämme waren toxisch.

2.2. Clostridien-Toxine

Die Toxine der einzelnen Clostridiumarten zeichnen sich durch sehr hohe Toxizität aus und gehören mit zu den stärksten biologischen Giften (Rolle, Mayr 1978). Das Gift der einzelnen Clostridiumarten und -typen läßt sich

in Hauptletaltoxine, die sogenannten
Majortoxine,
und in Nebenletaltoxine bzw. nicht-
letale Toxine einteilen (Warrack 1963).

Darüberhinaus setzen sich diese Toxine häufig aus einzelnen verschieden wirksamen Toxinkomponenten zusammen, die von den Arten und Typen der Clostridien in unterschiedlicher Anzahl und Menge produziert werden. Außerdem besitzen diese einzelnen Toxinfraktionen verschiedenartige enzymatische Aktivitäten. Einen Überblick über die Toxine der Clostridien gibt Abbildung 1.

C. botulinum bildet 7 verschiedene Toxine (6 typenspezifische Neurotoxine, 1 Hämagglutinin) aus, die mit den Buchstaben A-G bezeichnet werden und eine unterschiedliche Toxizität gegenüber Menschen und Tieren aufweisen (Ajil et al. 1970). Die Toxine A, B, E und F findet man vor allem bei Vergiftungen des Menschen. Toxin A erweist sich nur für Hund und Huhn als toxisch. Empfänglich für Toxin C alpha sind Enten, für C beta Hund, Huhn und Pferd. Intoxikationen bei Rindern, Pferden und Ziegen bewirkt Toxin D, während Toxin E nur für das Pferd und den Menschen toxisch ist (Rolle, Mayr 1978).

Tetanustoxin besteht aus Tetanospasmin, das ein Neurotoxin darstellt, einem nicht krampfauslösenden Neurotoxin, und aus dem letalen, hämolytisch und kardiotoxisch

wirkenden Tetanolysin. Es schädigt das Gewebe nicht, sondern lagert sich an das Nervengewebe an (Ajil et al. 1970).

C. novyi produziert wasserlösliche Toxine, die empfindlich gegenüber Sauerstoffeinwirkung sind. Durch halbstündiges Erhitzen auf 50°C im Wasserbad sowie durch Säuren und Laugen lassen sie sich zerstören. Während Oakley und Warrack (1953) nur von 6 biologisch aktiven Antigenen der *C. novyi*-Typen sprechen, berichtet Schallehn (1975) von 8 verschiedenen gewebeschädigenden Toxinen und Enzymen der 4 *C. novyi*-Typen. Die einzelnen Toxinkomponenten werden von folgenden Typen gebildet: *C. novyi* Typ A: alpha, gamma, delta, epsilon-Toxin, pathogen für Mensch, Meerschweinchen, Kaninchen, Ratte, Maus und Taube; *C. novyi* Typ B: alpha, beta, zeta, eta-Toxin, wofür Mensch, Schaf, Kuh, Pferd, Schwein, Geflügel, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte und Maus empfänglich sind; *C. novyi* Typ C: gamma-Toxin verursacht Osteomyelitis bei Wasserbüffeln auf Java; *C. novyi* Typ D: beta-Toxin erregt Ikterohämoglobinurie beim Rind. Als das klassische letale nekrotisierende Exotoxin von *C. novyi* bezeichnet Schallehn (1975) das alpha-Toxin.

Die 5 *C. perfringens* Typen A, B, C, D, E bilden 4 Hauptletaltoxine (alpha, beta, epsilon, jota) und 8 Nebentoxine (gamma, delta, zeta, eta, kappa, lambda, my und ny Brooks et al. 1957). Die Verteilung der einzelnen Toxinkomponenten ist in Abb. 2 zusammengefaßt. Zeissler, Rassfeld-Sternberg (1943) beschrieben zusätzlich den Typ F, ein hitzeresistenter Stamm von *C. perfringens*, welcher aus einem Mann in Deutschland isoliert wurde, der eine Lebensmittelvergiftung aufwies, und sie bezeichneten diesen Stamm als Typ F.

C. septicum bildet das letale, hämolytische alpha-Toxin und beta-Toxin, das eine Desoxyribonuklease darstellt (Ajil et al. 1970). *C. sordelli* produziert ein ödembildendes hämolytisches Toxin (Ajil et al. 1970). *C. chauvoei* erzeugt ein zytolytisches Lysin (Ajil et al. 1970).

2.3. Bedeutung der Clostridien als Krankheitserreger

Die von den Clostridien gebildeten Toxine, bei denen es sich hauptsächlich um Ektotoxine handelt, spielen in der Ätiologie und Pathogenese der von ihnen bei Mensch und Tier hervorgerufenen Krankheiten, eine dominierende Rolle. Von den insgesamt ca. 60 verschiedenen Clostridienarten sind aber nur wenige für Mensch und Tier pathogen, und zwar *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. tetani*, *C. botulinum*.

Nach Seifert (1975) lassen sich die charakteristischen, durch Clostridien verursachten Krankheiten in 3 große Gruppen unterteilen:

1. die Gasödem- bzw. Gasbrand-Erkrankung,
bei der die Erreger in das Patientengewebe eindringen und sich darin vermehren, wobei die von den Bazillen gebildeten Toxine zu charakteristischen histopathologischen Veränderungen führen (*C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. chauvoei*),
2. der Enterotoxämie-Komplex,
gekennzeichnet durch die Resorption von den im Verdauungstrakt gebildeten Toxinen (*C. perfringens*),
3. der Toxämie-Komplex (Tetanus und Botulismus), für den die Resorption parenteral oder in der Nahrung außerhalb des Körpers gebildeter Gifte typisch ist.

Einen detaillierten Überblick über das charakteristische Krankheitsbild und das Wirtsspektrum der einzelnen Clostridien-Arten bzw. -Typen gibt Abb. 2.

2.4. Kombinationsimpfung gegen Clostridien-Toxine

2.4.1. Begriffsbestimmung

Die Entwicklung auf dem Impfssektor zielt in den letzten Jahren immer mehr darauf hin, Mischimpfstoffe herzustellen, die entweder als polyvalente Impfstoffe oder als Kombinationsimpfstoffe bezeichnet werden. Während sich ein polyvalenter Impfstoff aus unterschiedlichen Serotypen einer einzigen Spezies zusammensetzt, enthält eine Kombinationsvakzine mehrere Antigene unterschiedlicher Mikroorganismen. Dabei beinhaltet ein Kombinationsimpfstoff zwei oder mehrere Einfachimpfstoffe gegen spezifische Infektionskrankheiten. Jeder immunisierende Anteil kann für sich allein als selbstständiger Impfstoff in Gebrauch sein. Deshalb werden Kombinationsvakzine vor allem zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten eingesetzt, die durch Mischinfektionen verursacht werden, wobei das Infektionsgeschehen durch verschiedene Erreger geprägt wird (Mayr 1977).

Die Vorteile einer Kombinationsimpfung bestehen in einer Vereinfachung des Impfkalenders, Reduzierung der Anzahl der Impfungen, Kostenersparnis - besonders in der modernen industrialisierten Massentierhaltung, Verringerung der Zusatzstoffe, Verbesserung der Impfhygiene und einer additiven Wirksamkeit, die manche Antigene in der Kombination entfalten. Außerdem schaffen sie eine günstige Abwehrlage gegen Erreger, die weitverbreitet und gemischt vorkommen (Mayr 1977).

2.4.2. Kombinationsimpfstoffe gegen C.-Toxine

Alle bisher geprüften Kombinationsvakzinen gegen Clostridientoxine setzten sich aus zwei oder mehr Toxoiden von *C. tetani*, *novyi*, *perfringens*, *septicum* und *botulinum* zusammen. Die Kombinationsvakzinen enthielten dabei mindestens 2 bis maximal 8 Toxoide (Bittner 1963, Klose 1970, Nedjalkov et al. 1973, Vlasova 1969, Larina 1966, Aleksandrov 1970). In einem Fall wurden auch an Stelle der inaktivierten Toxine die inaktivierten Bakterien (somatisches Antigen) verwendet (Rafyi et al. 1961, Pier-son 1968). Die Toxine bzw. Bakterienzellen wurden stets mit Formalin in einer Konzentration von 0,2-0,6% bei 1-14 tägiger Einwirkung inaktiviert (Choman 1969, Rafyi et al. 1961, Helwig et al., Bittner et al. 1963). Fast bei allen Kombinationsvakzinen wurden zusätzlich Adjuvantien beigefügt. Sehr häufig kamen Aluminiumphosphat (Cardella et al. 1960, Hepple et al. 1960), Aluminiumhydroxid (Saxinger et al. 1951, Radvilla et al. 1965, Quesada et al. 1972), Alaun (Grigoriu et al. 1966, Helwig et al., Thompson et al. 1953) und Mineralöle (Katsaras et al. 1973, Claus 1964) zur Anwendung.

Die Immunisierungsergebnisse lassen sich schwer zusammenfassend darstellen, da zum Teil erhebliche Unterschiede in den einzelnen Versuchen bestanden (z.B. bei den Impfstoffkomponenten, der Dosierung, der Anzahl der Impfungen oder den Applikationsformen).

Bittner (1963) verglich die Wirksamkeit einer monovalenten Vakzine von *C. perfringens*-, *C. novyi*- und *C. septicum*-Toxoid mit der Kombinationsvakzine aus diesen 3 Toxoiden an Mäusen, Meerschweinchen, Kaninchen und Schafen. Die Impfdosis betrug 100-250 I_b pro ml für *C.*

perfringens-Toxoid und *C. novyi*-Toxoid bzw. 90-900 Lb pro ml für das *C. septicum*-Toxoid. Die Kombinationsvakzine aus *C. perfringens*- und *C. septicum*-Toxoid lieferte bei gleicher Dosierung 2-3fach niedrigere Antitoxinspiegel als die entsprechenden monovalenten Impfstoffe. Nur wenn in der Kombinationsvakzine die halbe Toxoiddosis enthalten war, wurde mit der Kombinationsvakzine das gleiche Ergebnis erreicht wie nach Immunisierung mit dem Einfachimpfstoff.

Klose et al. (1970) immunisierten Meerschweinchen mit Tetanus-Toxoid (Tetanol, BEHRINGWERKE) und Al-Novyi-Toxoid (= *C. novyi*-Formol-Toxoid mit 0,2% $\text{Al}(\text{OH})_3$) zweimal in 4-wöchigem Intervall. Die eine Hälfte der Tiere erhielt die Impfstoffe getrennt, die andere Hälfte die Impfstoffe in der Spritze gemischt. Alle schutzgeimpften Tiere überlebten 2 und 4 Monate nach der letzten Impfung die subkutane Belastung mit einer tödlichen Dosis *C. novyi*-Toxin bzw. *C. tetani*-Toxin.

Choman (1969) stellte eine Kombinationsvakzine aus *C. chauvoei*, *C. septicum* und *C. novyi* her, indem er die 3 Stämme im gleichen Medium züchtete. Meerschweinchen, die mit 0,1 ml dieser Vakzine geimpft wurden, waren nach 10 Tagen gegen eine Belastung mit einer Kultursuspension aus *C. chauvoei*, *C. septicum* und *C. novyi* vollkommen geschützt.

Schafe, mit einer Kombinationsvakzine aus *C. perfringens* Typ B, C und D, *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* und *C. tetani* in einer Ölemulsion (30% Wasser und 70% Öl) geimpft, hatten 2 Wochen nach einer einmaligen interperitonealen Immunisierung Schutztiter gegen alle enthaltenen Komponenten im Serum (Thomson et al. 1969).

Nedjalkov et al. (1973) impften mit einer Kombinationsvakzine gegen *C. perfringens* Typ C und D sowie mit einer Kombinationsvakzine gegen *C. perfringens* Typ C und D und *C. gigas* (= *C. novyi* Typ B), die im Verhältnis 2:2:1 gemischt wurden. Kaninchen, die zweimal innerhalb von 15 Tagen mit je 3 ml des Zweifachimpfstoffes immunisiert wurden, bildeten eine bessere Immunität gegenüber *C. perfringens* Typ C-Antigen aus als gegen Typ D-Antigen. Eine Dosiserhöhung bei einem der Antigene verbesserte zwar die Immunantwort gegenüber diesem Antigen, führte aber in einigen Fällen zu einem Nachlassen der Immunantwort gegenüber den anderen Antigenen. Die alleinige Immunisierung mit einem der Toxoide in Dosen, wie sie in der Kombinationsvakzine aus *C. perfringens* Typ C und D und *C. gigas* verwendet wurden, ergab nur unwesentlich höhere Titer.

Vlasova et al. (1969) immunisierten gegen die Gasödem-Erkrankung und Tetanus mit einer Kombinationsvakzine, die aus *C. tetani*-, *C. perfringens*-, *C. novyi*-, *C. septicum*-, *C. sordelli*- und *C. histolyticum*-Toxoid bestand. Als Adjuvans wurde Aluminiumhydroxid verwendet. Kaninchen und Meerschweinchen wurden mit je 1,0 ml kombinierten und einfachen Toxoidimpfstoffen 2mal im Abstand von 30 Tagen immunisiert. 6 Monate p. vacc. erfolgte eine Reimmunisierung mit dem entsprechenden Impfstoff. Bereits nach der einmaligen Impfung konnten im Blut Antitoxine gegen alle Toxoidkomponenten festgestellt werden. Die Antitoxintiter für *C. novyi*, *C. sordelli* und *C. histolyticum* waren bei der Impfung mit dem monovalenten Impfstoff höher als bei dem kombinierten Impfstoff. Nach der 2. Impfung waren alle Antitoxintiter erhöht (5-20fach). Die kombinierte Immunisierung mit der halben Toxoiddosis erbrachte bei *C. sor-*

delli und -histolyticum einen höheren Antitoxintiter als die monovalente Impfung mit der doppelten Dosis.

Larina (1966) testete ein Oktaanatoxin, bestehend aus C. perfringens-, C. novyi-, C. tetani-, C. botulinum A-, C. botulinum B- und C. botulinum C-, D-, E-Toxoid an 22 Rhesusaffen. Schon nach einer einmaligen subkutanen Impfung wurden, mit Ausnahme von C. perfringens, spezifische Antikörpertiter im Schutzbereich erzielt. Nach der 2. Impfung im Abstand von 50 Tagen stiegen die Antikörpertiter zunächst an, fielen dann aber 3 1/2 Monate nach der Zweitimpfung wieder ab. Sie blieben jedoch, mit Ausnahme von C. perfringens, im Schutzbereich.

Nach Boosterimpfung per Aerosol mit einer Kombinationsvakzine aus C. perfringens- und C. novyi-Toxoid maßen Gefen et al. (1975) beim Menschen einen Anstieg der Antikörpertiter. Der aerogenen Revakzination war ein Jahr zuvor eine zweimalige Grundimmunisierung mit einer Kombinationsvakzine aus Salmonella paratyphi, C. perfringens und C. novyi vorausgegangen.

Aleksandrov et al. (1970) immunisierten Meerschweinchen und Kaninchen mit Botulinum A-, Botulinum B-, Tetanus-Toxoid und Typhus-Antigen. Zur Erstimmunisierung erhielten die Tiere zweimal 0,1 ml parenteral. Zur Revakzination wurden sie 30 Minuten einem Aerosol mit der Tri- oder Tetravakzine ausgesetzt. Bei allen Tieren hatte die 30-minütige Exposition schon nach 10 Tagen einen beachtlichen Antikörperanstieg gegen sämtliche Antigene zur Folge. Der Titer gegen Botulismus Toxin A und B sowie gegen Tetanustoxin erhöhte sich um etwa 2 log-Stufen. Die geimpf-

ten Kaninchen überlebten eine Belastung mit einer sicher tödlichen Dosis *C. botulinum* A- und B-Toxin.

2.4.3. Applikation

Die Applikation der Kombinationsimpfstoffe gegen Clostridientoxine erfolgt in der Regel subkutan (Dedie 1957, Rafiyi et al. 1961, Klose et al. 1970, Nedjalkov et al. 1973, Vlasova et al. 1969, Djurichovic et al. 1975) oder intramuskulär (Bittner 1963, Jansen 1969, Mellanby et al. 1964). In einigen Fällen wurde auch interperitoneal (Thomson et al. 1969, Kerry et al. 1969) und aerogen (Wigley 1969, Gefen et al. 1975, Aleksandrov et al. 1970, Shulman-Satin et al. 1969) geimpft.

In einem vergleichenden Versuch mit der intramuskulären und subkutanen Kombinationsschutzimpfung mit *C. novyi*- und *C. tetani*-Toxoid waren die erzielten Antitoxin-Titer im Serum der Tiere bei beiden Applikationsmethoden in etwa gleich (Klose et al. 1967).

Nach Kerry et al. (1969) konnten durch die interperitoneale Applikation der Clostridium-Vakzinen häufig die lokalen Reaktionen, die bei subkutaner und intramuskulärer Injektion wiederholt in Erscheinung traten, vermieden werden. Thomson et al. (1969) sahen keine Unterschiede in der Immunitätsausbildung zwischen subkutaner, intramuskulärer oder interperitonealer Impfung mit Clostridien-Kombinationsvakzinen.

Die aerogene Applikation eignete sich nur für die Boosterimpfung, denn bei der Erstimpfung war die subkutane Applikation bezüglich der Ausbildung von Antitoxinen der aerogenen überlegen (Wigley et al. 1969, Gefen et al. 1975).

Abb.:1 Überblick über die verschiedenen Clostridien-Toxine

Erreger	Typ	Toxin	biologische Aktivität	enzymatische Aktivität
C.botulinum		A,B,C, D,E,F, G	neurotoxisch	
C.chauvoei				zytolytisches Lysin
C.septicum		alpha	letal, nekrotisch hämolytisch	
		beta		Desoxyribonu- lease
		gamma		Hyaluronidase
		delta	nekrotisch, hämolytisch	
C.novy	A	alpha	letal, nekrotisch	
		gamma	hämolytisch, nekrotisch, letal	Lecithinase
		delta	hämolytisch	sauerstofflabi- les Hämolysin
		epsi- lon		Lipase
	B	alpha	s.o.	
		beta		Lecithinase
		zeta	hämolytisch	sauerstofflabi- les Hämolysin
		eta		Tropomyosinase
	C	gamma	s.o.	s.o.
	D	beta		s.o.
		zeta	s.o.	s.o.
		eta		s.o.

Fortsetzung Abb. 1

Erreger	Typ	Toxin	biologische Aktivität	enzymatische Aktivität
C.perfringens	A	alpha	letal, nekrot., hämolytisch	Lecithinase
		theta	letal, hämolytisch	
		kappa		Collagenase
		my		Proteinase Gelatinase
		ny		Desoxyribonuklease
	B	alpha	s.o.	s.o.
		beta	letal, nekrotisch	
		epsilon	letal, nekrotisch	
		theta	s.o.	
		kappa		s.o.
	C	alpha	s.o.	s.o.
		beta	s.o.	
		theta	s.o.	
		kappa		s.o.
		ny		s.o.

Fortsetzung Abb. 1

Erreger	Typ	Toxin	biologische Aktivität	enzymatische Aktivität
C.perfringens	D	alpha	letal, nekrot., hämolytisch	Lecithinase
		epsilon	letal, nekrotisch	
		theta	letal, hämolytisch	
		kappa		Collagenase
		lambda		Proteinase Gelatinase
		my		Proteinase Gelatinase
		ny		Desoxyribonuklease
	E	alpha	s.o.	s.o.
		jota	letal, nekrotisch	
		theta	s.o.	
		kappa		s.o.
		lambda		s.o.
		ny		s.o.
C.tetani		Tetanolysin	hämolytisch, letal, kardiotox.	
		Tetanospasmin	neurotoxisch	

- 1) Literatur bei Al-Khatib (1968), Beer et al. (1968), Hauschild (1965), Hardegree et al. (1971), Joubert (1967), Katsaras et al. (1976), Möllby et al. (1976), Schneider (1971), Smyth (1978)

Abb.: 2 Überblick über die wichtigsten Krankheiten nach
Clostridien-Infektionen

Erreger	Typ	Krankheit	Tierart
C. botulinum		Botulismus	Haus- und Wasser- geflügel, Rind, Schaf, Pferd, Nerz
		Lamziekte (Läh- mungsseuche der Rinder)	Rind, Schaf
		Limberneck	Huhn
C. chauvoei		Rauschbrand	Rind, Schaf, Büf- fel, Hirsch
C. novyi	A	Gasbrand	Mensch
		Gasödem	Haussäugetiere
	B	Deutscher Bradsot (Nekr.Hepatitis)	Schaf
	C	Osteomyelitis	Wasserbüffel
	D	infektiöse Ikte- rohämoglobinurie	Rind
C. septicum		pararauschbrand (malignes Ödem)	Haussäugetiere
		Nord. Bradsot	Schaf
C. tetani		Tetanus (Wundstarrkrampf)	Haussäugetiere, insbes. Pferd, Mensch

Fortsetzung Abb. 2

Erreger	Typ	Krankheit	Tierart
C.perfringens	A	Gasbrand, Gasödem	Haussäugetiere
		Nekrot. Mastitis	Rind, Schaf, Ziege
		Enterotoxämie	Schwein, Pelztiere
	B	Lämmerdysenterie	Schaf
		Enterotoxämie	Kalb, Rind
	C	Struck d. Schafes	Schaf
		Nekrot. Enteritis der Saugferkel	Schwein
		Enterotoxämie	Kalb, Rind
		Quail Disease	wildlebende Vögel, Hausgeflügel
	D	Breinierenkrankheit	Schaf
		Enterotoxämie	Kalb, Rind, Schwein
	E	Enterotoxämie	Kalb, Rind

- 1) Literatur bei Amtsberg et al. (1977), Bagadi (1974), Beer et al. (1960), English (1966), Griesemer (1962), Katitch (1961), Köhler et al. (1973), Schallehn (1970), Seftner (1959), Stamp (1963)

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Versuchstiere

Wir verwendeten weibliche NMRI-Mäuse mit einem durchschnittlichen Gewicht von 18-20 g bei Versuchsbeginn. Die Mäuse wurden in Gruppen von jeweils 10 Tieren in Makro-lonkägigen gehalten. Die Fütterung der Tiere erfolgte durch Pellets der Fa. ALTROMIN, Lage/Lippe und Leitungswasser ad libidum. Die Kontrolltiere lebten unter gleichen Bedingungen.

3.1.2. Impfstoffe

Zur Immunisierung kamen zur Anwendung:

- a) gereinigtes, mit Formalin inaktiviertes C. tetani-Toxin der Fa. BEHRINGWERKE AG, Marburg/Lahn. Es enthielt 1 000 Lf¹⁾ pro ml,
- b) gereinigtes, mit Formalin inaktiviertes C. novyi-Toxin (Typ A) der Fa. BEHRINGWERKE AG, Marburg/Lahn, mit 80 BE (Bindungseinheiten) pro ml,
- c) gereinigtes, mit Formalin inaktiviertes C. perfringens-Toxin (Typ A) der Fa. WELLCOME.

Folgende Impfstoffe wurden geprüft:

- a) Einfachimpfstoffe von
 - Tetanus-Toxoid (Fa. BEHRINGWERKE AG)
 - Novyi-Toxoid (Fa. BEHRINGWERKE AG)
 - Perfringens-Toxoid (Fa. WELLCOME)
- b) Kombinationsimpfstoff von
 - Tetanus/Novyi-Toxoid
 - Tetanus/Perfringens-Toxoid
 - Tetanus/Novyi/Perfringens-Toxoid

1) Lf = Limes flocculationis = Flockungseinheit

3.1.3. Immunisierung

Die Toxoide wurden entweder subkutan, d.h. unter die Rücken-
haut der Tiere, oder intranasal appliziert. Die Impfstoffmenge betrug jeweils 0,5 ml (subkutan) und 0,05-0,1 ml (intranasal). Die Impfdosis betrug beim Tetanus-Toxoid 2 Lf bei subkutaner Applikation und bei intranasaler Applikation 100 Lf. Das Novyi-Toxoid der Fa. BEHRINGWERKE AG kam in einer Dosis von 4 BE bei subkutaner und in einer Dosis von 2 BE bei intranasaler Applikation zur Anwendung. Das C. perfringens-Toxoid der Fa. WELLCOME wurde mit einer Impfdosis von 9 Lf (subkutan) und 0,9 Lf (intranasal) appliziert.

3.1.4. Aktiver Mäuseschutzversuch

Nach der Toxizitätsprüfung erfolgte die Belastung subkutan sowohl mit C. tetani-Toxin und C. novyi-Toxin der Fa. BEHRINGWERKE AG als auch mit C. perfringens Typ A-Toxin der Fa. WELLCOME. Die LD₅₀ wurde an Mäusen bestimmt. Die Belastungsdosis betrug bei C. novyi und C. tetani 10 LD₅₀ und bei C. perfringens 2 LD₅₀. Sie war so eingestellt, daß in allen Belastungsversuchen 100% der Kontrolltiere innerhalb von 2 Tagen starben.

3.1.5. Auswertung der Schutzversuche

Der Verlauf der Schutzversuche wurde über die Dauer von 6 Tagen beobachtet. Die Beurteilung erfolgte nach folgenden Kriterien:

Tiere, deren Allgemeinbefinden während der Beobachtungszeit nicht gestört war und die keine Intoxikationserscheinungen zeigten, galten als immun bzw. geschützt.

Tiere, die innerhalb von 6 Tagen spezifisch infolge der Toxinwirkung starben, wurden als nicht immun bzw. nicht geschützt gewertet. Den dabei erzielten Wirksamkeits-

index (WI) errechneten wir nach folgender Formel:

$$WI = \frac{a - b}{a} \cdot 100$$

a = Anzahl der belasteten Tiere

b = Anzahl der nach der Belastung gestorbenen Tiere

3.1.6. Neutralisationsversuch

Die zu prüfenden Seren (*C. perfringens*) wurden zu gleichen Teilen mit verschiedenen Toxinverdünnungen versetzt und eine Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Von den Toxin-Serum-Gemischen wurden 0,4 ml interperitoneal an 4 Mäuse verimpft. Parallel dazu injizierten wir gleichaltrigen und gleichschweren Kontrolltieren physiologische NaCl-Lösung bzw. Immuneserum mit der entsprechenden Toxinverdünnung.

3.1.7. Indirekte Hämagglutination

3.1.7.1. Immuneserumherstellung

Im Abstand von 4-6 Tagen wurden Kaninchen mit steigenden Dosen Tetanus- bzw. Novyi-Toxoid intravenös immunisiert. Die Toxoidmenge schwankte zwischen 2-20 Lf (Tetanus) und 1-10 BE (Novyi). 8 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Kaninchen entblutet und die so gewonnenen Seren nach Zentrifugation bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.1.7.2. Gewinnung der Mäuseseren

Das für die serologische Untersuchung benötigte Blut wur-

de durch Dekapitation der Tiere gewonnen. Das Blut von 5 Mäusen wurde gepoolt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 3 000 UPM¹⁾ erfolgte die Lagerung der Seren bis zum Zeitpunkt der Auswertung bei -20°C.

3.1.7.3. Behandlung der Seren

Die Seren wurden vor der Durchführung der Tests bei 56°C im Wasserbad 30 Minuten inaktiviert und anschließend mit Erythrozyten absorbiert. Dazu wurde 1 Tropfen gewaschener Erythrozyten zu je 1,0 ml Serum pipettiert und nach einstündiger Inkubation bei 37°C wieder abzentrifugiert.

3.1.7.4. Antigene

Als Antigene dienten uns C. tetani- bzw. novyi-Toxoide der Fa. BEHRINGWERKE AG (vgl. 3.1.2.).

3.1.7.5. Erythrozyten

Für den Nachweis der Tetanus- bzw. Novyi-Antitoxine verwendeten wir Hammelerythrozyten. Das Blut wurde in Alseverlösung aufgenommen, dreimal in physiologischer NaCl gewaschen. Zur Sensibilisierung der Erythrozyten wurde eine 10%ige Erythrozytensuspension in PBS hergestellt. 1 Volumenteil dieser Erythrozytensuspension wurde mit 2 Volumenteilen Tetanus-Toxoid (1 000 Lf/ml) bzw. Novyi-Toxoid (80 BE) und 1 Volumenteil 1%ige Glutaraldehydlösung gemischt. Nach 2stündiger Bebrütung im Brutschrank bei 37°C, während der das Gemisch jede halbe Stunde gut geschüttelt wurde, wurden die sensibilisierten Erythrozyten 3mal in physiologischer NaCl gewaschen und auf eine Konzentration von 0,5% eingestellt.

1) Cryofuge, 6-6, Fa. Heraeus Christ

3.1.7.6. Durchführung des Tests

Von den Mäuseseren legten wir zuerst in Agglutinationsröhrchen eine Verdünnungsreihe in 2er Potenzen mit 0,3 ml Serum an. Zu jeder Verdünnungsstufe wurden 0,3 ml sensibilisierte Erythrozyten pipettiert. Als Kontrolle testeten wir ein Kaninchenimmenserum (positive Serumkontrolle). Ferner prüften wir die verwendete PBS-Lösung mit sensibilisierten Erythrozyten (PBS-kontrolle) sowie alle Seren mit nicht sensibilisierten Erythrozyten (Serumkontrolle) auf unspezifische Reaktionen. Nach 2stündigem Bebrüten bei 37°C wurden die Gemische kräftig aufgeschüttelt und 18 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Ablesung der Reaktion.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Prüfung auf Unschädlichkeit

Die Unschädlichkeit der Impfstoffe wurde an 18g schweren Mäusen bei subkutaner und intranasaler Applikation geprüft. Bei subkutaner Verabreichung von 0,5 ml der jeweiligen Impfstoffe allein oder in kombinierter Form wurden weder lokale Reaktionen noch Störungen im Allgemeinbefinden der Tiere beobachtet. Ebenso traten bei intranasaler Applikation (0,05-0,1 ml) der Impfstoffe keinerlei Nebenerscheinungen auf.

3.2.2. Prüfung auf Wirksamkeit

Um die Wirksamkeit einer Kombinationsvakzine gegen Tetanus und Gasbrand bestimmen zu können, mußte in ersten Vorversuchen an geeigneten Modellen die Wirksamkeit der entsprechenden monovalenten Impfstoffe geprüft werden. Als Impfstoffkomponenten für die Kombinationsvakzine wählten wir *C. tetani*-, *C. novyi*- und *C. perfringens*-Toxoid. Dementsprechend bestimmten wir zunächst die Wirksamkeit einer monovalenten Impfung gegen Tetanus, *Novyi*, *Perfringens*, wobei der Impfstoff entweder subkutan oder intranasal appliziert wurde. Als Wirksamkeitsnachweis galt einmal der Vergleich der Überlebensrate nach Belastung mit Toxinen bei geimpften und nicht geimpften Mäusen, der im Wirksamkeitsindex ausgedrückt wurde, zum andern die Bestimmung postvakzinaler Antitoxine mittels indirekter Hämagglutination (*Tetanus*, *Novyi*) bzw. mit dem Neutralisationstest (*Perfringens*). Die Ergebnisse im einzelnen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Im Falle des Tetanus-Impfstoffes erzielten wir durch eine einmalige subkutane Impfung mit 2 Lf formalininaktiviertem Tetanus-Toxin einen Wirksamkeitsindex von 100, d.h. alle geimpften Mäuse überlebten den Toxinchallenge mit 10 LD₅₀ Tetanus-Toxin, während alle nicht geimpften Tiere starben. Das Ergebnis nach intranasaler Applikation des Tetanus-Impfstoffes fiel etwas schlechter aus. Trotz 50facher subkutaner Dosis konnten wir hier nur einen Wirksamkeitsindex von 60 errechnen. Dieser Unterschied zwischen nasaler und subkutaner Applikation manifestierte sich auch im Antitoxintiter 14 Tage p. vacc. Bei den subkutan geimpften Mäusen stieg der Titer von negativ (vor der Impfung) auf 1:64, bei den intranasal geimpften Mäusen von negativ auf 1:16.

Mit dem Novyi-Impfstoff ergaben sich keine so günstigen Wirksamkeitswerte. Die Ursache hierfür lag vor allem an der etwas schwächeren immunisierenden Kapazität des Ausgangstoxoids, was sich besonders auf die intranasale Impfung negativ auswirkte. Nach subkutaner Impfung von Mäusen mit 4 BE Novyi-Toxoid erzielten wir einen Wirksamkeitsindex von 60, nach intranasaler Impfung von 2 BE Toxoid nur einen von 10. Eine Verbesserung des nasalen Immunisierungsergebnisses durch Steigerung der Impfdosis (z.B. wie bei der Tetanusimpfung) war nicht möglich, weil wir der Maus intranasal maximal nur 0,1 ml Impfstoff applizieren können, das Ausgangstoxoid aber nur einen Toxoidgehalt von 80 BE pro ml besaß. Der durchschnittliche postvakzinale Antitoxintiter nach subkutaner Impfung war mit 1:4 sehr niedrig. Nach nasaler Impfung ließen sich mittels indirekter Hämagglutination überhaupt keine Antitoxine nachweisen.

Die schlechteste Immunogenität der 3 geprüften Toxoiden hatte das *C. perfringens*-Toxoid. Um einen Wirksamkeitsindex von 80 zu erreichen, mußten wir subkutan 4,5 Lf injizieren. Dabei war es notwendig, bei einem Impfvolumen von 0,5 ml und einem Toxoidgehalt von 9 Lf/ml beim Ausgangstoxoid, das Toxoid unverdünnt zu applizieren. Nachdem intranasal nur 0,1 ml verimpft werden können, verringerte sich die nasale Impfdosis dementsprechend auf 0,9 Lf. Mit solch geringer Impfdosis ließ sich erwartungsgemäß bei der Maus keine Immunantwort mehr stimulieren. Bei den subkutan geimpften Mäusen lag der mittlere, mit dem Neutralisationsversuch bestimmte Antitoxintiter, bei 1:8.

Die Ergebnisse der monovalenten Impfungen dienten als Ausgangswerte, an denen die Wirksamkeit der Kombinationsimpfstoffe gemessen werden konnte, d.h. wir prüften, ob sich durch die Kombination der verschiedenen Toxoiden miteinander das Immunisierungsergebnis für das einzelne Toxoid verbesserte oder verschlechterte. Zur Anwendung kam ein Zweifach- und ein Dreifachimpfstoff auf der Basis der formalininaktivierten Clostridien-Toxine. Einen Überblick über die Wirksamkeit der Tetanus-Schutzimpfung bei Mäusen, die allein oder in Kombination mit Novyi- und Perfringens-Toxoid subkutan oder intranasal immunisiert wurden, gibt Tabelle 2.

Bei der Herstellung der 3 verschiedenen Impfstoffe wurde darauf geachtet, daß die Toxoiddosis für die einzelnen Clostridienarten in jeder Vakzine gleich war. Die Dosis im einzelnen betrug bei der subkutanen Impfung für das Tetanus-Toxoid 2 Lf, für das Novyi-Toxoid

4 BE und für das Perfringens-Toxoid 4,5 Lf. Bei der intranasalen Impfung lagen die Dosen bei 100 Lf (Tetanus-Toxoid), 2 BE (Novyi-Toxoid) und 0,9 Lf (Perfringens-Toxoid).

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, war im Challenge-Versuch mit 10 LD₅₀ Tetanus-Toxin bei den subkutan immunisierten Mäusen kein Unterschied festzustellen zwischen den monovalenten und den kombinierten Impfstoffen. Der Wirksamkeitsindex betrug immer 100. Bei der serologischen Untersuchung zeigte sich sogar, daß der Dreifachimpfstoff dem monovalenten und dem Zweifachimpfstoff überlegen war. Der Tetanusantitoxintiter nach Impfung mit dem monovalenten Impfstoff lag bei 1:32, der nach Impfung mit dem Kombinationsimpfstoff "Novyi-Tetanus" bei 1:16. Demgegenüber stellten wir bei den Mäusen, die mit dem Dreifachimpfstoff einmal subkutan geimpft wurden, einen mittleren Tetanusantitoxintiter von 1:512 fest.

Bei der intranasalen Tetanus-Impfung ließ sich der Wirksamkeitsindex von 60 nach monovalenter Impfung auf 80 steigern nach Verwendung des Zweifach- bzw. Dreifachimpfstoffes. Dieser Vorteil zeigte sich auch im höheren Antitoxintiter. 14 Tage nach alleiniger Tetanus-Impfung lagen die mittleren Antitoxintiter bei 1:16, nach Impfung mit dem Zweifachimpfstoff (Tetanus-Novyi) bei 1:32 und nach Impfung mit dem Dreifachimpfstoff (Tetanus-Novyi-Perfringens) bei 1:64.

Die Ergebnisse der Wirksamkeitsbestimmung bei C. novyi mit dem monovalenten Impfstoff im Vergleich zu kombinierten Vakzinen wurden in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Der Wirksamkeitsindex bei subkutan mit 4 BE Novyi-Toxoid geimpften Mäusen nach Belastung mit 10 LD₅₀ Novyi-Toxin lag für den Einfachimpfstoff bei 60, für den Zweifachimpfstoff bei 55 und für den Dreifachimpfstoff bei 80. Postvakzinale Antitoxintiter gegen C. novyi ließen sich nur bei den mit dem Dreifachimpfstoff subkutan immunisierten Tieren nachweisen. Der Antitoxintiter war aber auch in dieser Gruppe mit 1:16 relativ niedrig. Ein sehr viel schlechteres Ergebnis stellten wir mit der intranasalen Impfung fest, was vor allem mit der bereits erwähnten niedrigen Immunogenität des Ausgangstoxoid-Konzentrats zusammenhing. Die Wirksamkeitsindizes lagen nach intranasaler Impfung allein mit 2 BE Novyi-Toxoid bei 10, mit dem Zweifachimpfstoff ebenfalls bei 10 und mit dem Dreifachimpfstoff bei 15. Im Serum aller mit C. novyi-Toxoid intranasal geimpften Mäuse konnten wir keine spezifischen Antitoxine gegen das Novyi-Toxin nachweisen.

Abschließend wurde die Wirksamkeit der Schutzimpfung gegen das Perfringens-Toxin untersucht. Einen Überblick der Ergebnisse im einzelnen vermittelt Tabelle 4. Für die subkutane Impfung mit 4,5 Lf Perfringens-Toxoid errechneten wir im Belastungsversuch unter Verwendung des Einfach- und Zweifachimpfstoffes einen Wirksamkeitsindex von 64. Ein etwas höherer Wert mit 80 ergab sich bei Anwendung des Dreifachimpfstoffes. Das etwas bessere Resultat des Dreifachimpfstoffes bestätigte auch die serologische Untersuchung. Nur bei Mäusen, die mit dem Dreifachimpfstoff geimpft wurden, ließen sich im Neutralisationsversuch spezifische Antitoxine nachweisen. Der Neutralisationstiter war mit 1:8 auch hier relativ gering.

Mit der intranasalen Impfung gegen *C. perfringens* konnte dagegen in keinem Fall eine nachweisbare Immunität stimuliert werden. Hierfür war sicherlich die zu geringe Impfdosis verantwortlich, die wir jedoch wegen des begrenzten Impfvolumens von 0,1 ml und des relativ schwachen Toxoidgehaltes unseres Ausgangskonzentrates nicht erhöhen konnten.

Tab. 1: wirksamkeit einer subkutanen oder intranasalen Schutzimpfung gegen C. tetani
C. novyi oder C. perfringens bei Mäusen

Impfung	Impfdosis		Ergebnis der Wirksamkeitsbestimmung 5)			
			3) Challengeversuch (Wirksamkeitsindex)		Antitoxinnachweis (Titer)	
	subkutane Impfung	nasale Impfung	subkutane Impfung	nasale Impfung	subkutane Impfung	nasale Impfung
C. tetani	2 Lf 1)	100 Lf	100	60	1:64	1:16
C. novyi	4 BE 2)	2 BE	60	10	1:4	negativ
C. perfringens	4,5 Lf 1)	0,9 Lf	64	0	1:8	n.d. 4)

1) Flockungseinheit

2) Bindungseinheit

3) sulzige Ödeme a. d. Foxininjektionsstelle

4) nicht durchgeführt

5) pro Gruppe n = 20

Tab. 2: Wirksamkeit einer Schutzimpfung gegen C. TETANI bei Mäusen, die mit Tetanus-Toxoid

allein oder in Kombination mit Novyi- und Perfringens-Toxoid subkutan und intranasal immunisiert wurden.

Impfstoff		Impfdosis		Ergebnis der Wirksamkeitsbestimmung ¹⁾		
				Challengeversuch (Wirksamkeitsindex)		
		subkutane Impfg.	nasale Impfg.	subkutane Impfung	nasale Impfung	subkutane Impfung
monovalent	Tetanus-Toxoid	2 Lf	100 Lf	100	60	1:32
						1:16
bivalent	Tetanus-Toxoid	2 Lf	100 Lf	100	80	1:32
	Novyi-Toxoid	4 BE	2 BE			
trivalent	Tetanus-Toxoid	2 Lf	100 Lf	100	80	1:512
	Novyi-Toxoid	4 BE	2 BE			
	Perfringens-Toxoid	4,5 Lf	1 Lf			1:64

1) pro Gruppe n = 20

Tab. 3: Wirksamkeit einer Schutzimpfung gegen C. NOVYI bei Mäusen, die mit Novyi-Toxoid allein oder in Kombination mit Tetanus- und Perfringens-Toxoid subkutan und intranasal immunisiert wurden

	Impfstoff	Impfdosis		Ergebnis der Wirksamkeitsbestimmung 1)		
				Antitoxinnachweis (Titer)		
		subkutane Impfg.	nasale Impfg.	subkutane Impfung	nasale Impfung	nasale Impfung
monovalent	Novyi-Toxoid	4 BE	2 BE	60	10	negativ
	Novyi-Toxoid	4 BE	2 BE			
bivalent	Tetanus-Toxoid	2 Lf	100 Lf	55	10	negativ
	Novyi-Toxoid	4 BE	2 BE			
trivalent	Tetanus-Toxoid	2 Lf	100 Lf	80	15	1:16
	Perfringens-Toxoid	4,5 Lf	1 Lf			negativ

1) pro Gruppe n = 20

Tab. 4: Wirksamkeit einer Schutzimpfung gegen C. PERFRINGENS bei Mäusen, die mit Perfringens-Toxoid allein oder in Kombination mit Tetanus- und Novyi-Toxoid subkutan immunisiert wurden

	Impfstoff	Impfdosis		Ergebnis der Wirksamkeitsbestimmung 2)		
				Antitoxinnachweis 1) (Titer)		
		sub- kutane Impfg.	nasale Impfg.	subkutane Impfung	nasale Impfung	subkutane Impfung
monovalent	Perfringens-Toxoid	4,5 Lf	0,9 Lf	64	0	negativ
	Perfringens-Toxoid	4,5 Lf	0,9 Lf	64	0	negativ
bivalent	Tetanus-Toxoid	2 Lf	100 Lf	64	0	negativ
	Perfringens-Toxoid	4,5 Lf	0,9 Lf	80	0	negativ
trivalent	Tetanus-Toxoid	2 Lf	100 Lf	80	0	negativ
	Novyi-Toxoid	2 BE	2 BE	80	0	negativ

1) Neutralisationsversuch bei der Maus

2) pro Gruppe n = 20

4. DISKUSSION

Die Untersuchungen haben bestätigt, daß es grundsätzlich möglich ist, gegen mehrere Clostridien-Toxine gleichzeitig mit einer Kombinationsvakzine zu immunisieren. Eine Kombinationsvakzine aus *C. perfringens* Typ A-, *C. novyi*- und *C. tetani*-Toxoid schützte Mäuse gegen die einzelnen Toxine ebenso gut wie die entsprechenden monovalenten Impfstoffe. Damit wurde erstmals bewiesen, daß eine kombinierte Gasbrand-Tetanus-Impfung möglich ist. Bisher liegen zwar mehrere Ergebnisse über Kombinationsvakzinen gegen Clostridieninfektionen vor (vgl. Schrifttum), dabei wurden aber in allen Fällen andere Kombinationen verwendet. Meist handelte es sich hierbei um Impfstoffe gegen Rauschbrand und Gasbrand ohne die Tetanus-Komponente. Außerdem fehlten Ergebnisse über die Immunogenität von *C. perfringens* Typ A-Toxoid in Kombinationsvakzinen bislang vollkommen. Gerade aber eine Kombination des klassischen Gasbrand-Impfstoffes mit der fest im Impfkalender verankerten Tetanus-Impfung wäre sinnvoll, da damit ohne Änderung der Impfprogramme ein umfassender Schutz gegen die wichtigsten Clostridieninfektionen möglich wäre. Dies trifft vor allem für die gegen Tetanus empfindlichen Spezies wie Mensch und Pferd zu, die regelmäßig gegen Tetanus geimpft werden.

Die Wirksamkeit der verschiedenen Kombinationsimpfstoffe war im Falle des Zweifachimpfstoffes gleich, im Falle des Dreifachimpfstoffes sogar besser, als die des Einfachimpfstoffes. Dabei spielte es keine Rolle,

ob der Impfstoff subkutan oder intranasal verabreicht wurde. Voraussetzung für dieses Ergebnis war die gleiche Dosierung in der Kombinationsvakzine wie bei dem Einfachimpfstoff. Die Gründe für die bessere Wirksamkeit des Dreifachimpfstoffes blieben unklar. Eine Kreuzimmunität zwischen *C. tetani* und *C. novyi* kann auf Grund der Untersuchungen von Trüdinger (1977) in jedem Fall ausgeschlossen werden. Ob eine Kreuzimmunität zwischen *C. perfringens* und *C. novyi* bzw. *C. tetani* vorhanden ist, muß erst geklärt werden. In der Literatur gibt es nur Anhaltspunkte für eine Kreuzimmunität zwischen *C. sordelli* und *C. bifermentans* (Clark et al. 1937), zwischen *C. perfringens*, *C. sporogenes*, *C. novyi* Typ A und B bzw. zwischen *C. tetani*, *C. bifermentans* und *C. sordelli* (Ellner et al. 1963).

Eine bessere Immunitätsbildung nach Impfung mit einem Dreifachimpfstoff gegen Clostridien-Toxine wurde auch von Choman (1969) mit einem Impfstoff auf der Basis von *C. chauvoei*-, *C. septicum*- und *C. novyi*-Toxoid beschrieben. Mit einer Kombinationsvakzine aus *C. perfringens*-, *C. novyi*- und *C. septicum*-Toxoid wurde dagegen nur die gleiche Wirkung erzielt, wenn die Dosis in der Kombinationsvakzine gegenüber dem Einfachimpfstoff um die Hälfte verringert wurde (Bittner 1963).

In unseren Untersuchungen hat sich gezeigt, daß die Qualität des Toxoids von Tetanus über Novyi zu Perfringens abnahm. Vor allem das *C. Perfringens*-Toxoid war relativ schwach immunogen. Die Tiere konnten nur vor der Mortalität nicht aber vor lokalen Reaktionen der Haut an der Toxininjektionsstelle geschützt wer-

den. Dies zeigt, daß selbst der bei der subkutanen Immunisierung mit unverdünntem Toxoid erreichte Impfschutz noch nicht optimal war. Da es sich hier um ein industriell, unter optimalen Bedingungen, hergestelltes Toxoid handelte, kann man folgern, daß das C. perfringens Typ A-Toxoid in der derzeitigen Qualität noch nicht reif ist für den Einsatz in der Praxis. Die bisher erreichten Titer verlangen schon bei der Maus eine unverdünnte Anwendung des Toxoids für ein ausreichendes Immunisierungsergebnis, was sich in größeren Mengen wirtschaftlich nicht vertreten läßt. Dies ist wahrscheinlich der Grund, weshalb das Typ A-Toxoid bisher noch nicht in Kombinationsvakzinen geprüft wurde, obwohl Typ A der klassische Gasbrand-erreger ist. Zukünftige Untersuchungen müssen sich deshalb auf die Herstellung eines C. perfringens Typ A-Toxoids konzentrieren.

Für die intranasale Impfung galten zwar die gleichen Gesetzmäßigkeiten wie bei der subkutanen, doch die Immunität war wesentlich schwächer, mit Ausnahme der Tetanus-Impfung. Man muß dabei berücksichtigen, daß nur bei der Tetanus-Impfung der Tatsache Rechnung getragen werden konnte, daß nasal etwa 20-50mal so viel Antigen verimpft werden muß wie subkutan, um das gleiche Immunisierungsergebnis zu erhalten. Durch das begrenzte nasale Impfvolumen (bei der Maus lassen sich auf einmal maximal nur 0,05-0,1 ml Flüssigkeit sicher nasal instillieren) konnten wir im Falle des Novyi- und Perfringens-Toxoids die Impfdosis nicht entsprechend steigern. Trotzdem kann

festgehalten werden, daß intranasal allein und in Kombination gegen Tetanus und Gasbrand immunisiert werden kann.

Die Verträglichkeit der von uns verwendeten Formoltoxide war in allen Fällen gegeben. Sowohl bei der subkutanen als auch bei der intranasalen Immunisierung wurden keine Lokal- bzw. Allgemeinreaktionen p. vacc. beobachtet.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde bei der Maus vergleichend die Wirksamkeit eines Einfach- und Mehrfachimpfstoffes gegen Gasbrand und Tetanus geprüft. Für die Immunisierung wurde formalininaktiviertes *C. tetani*-, *C. novyi*- und *C. perfringens*-Toxin allein oder kombiniert verwendet. Der Impfstoff wurde entweder subkutan oder intranasal appliziert. Zum Nachweis der Wirksamkeit wurde der Vergleich der Überlebensrate nach Belastung mit Toxinen bei geimpften und nicht geimpften Mäusen und die Bestimmung postvazinaler Antitoxine mit indirekter Hämagglutination (Tetanus und Novyi) bzw. Neutralisationstest herangezogen.

Die Ergebnisse beweisen, daß Mäuse mit den verwendeten Clostridien-Toxoiden sowohl allein als auch in Kombination wirksam und unschädlich immunisiert werden können. Während zwischen dem Einfachimpfstoff und dem Zweifachimpfstoff keine wesentlichen Wirksamkeitsunterschiede innerhalb der einzelnen Toxoide festgestellt werden konnten, war die Wirksamkeit durch Impfung mit dem Dreifachimpfstoff bei allen drei Toxoiden besser. Im Falle des Tetanus-Toxoids maßen wir mit dem Einfachimpfstoff einen postvazinalen Antitoxintiter von 1:32, mit dem Dreifachimpfstoff dagegen einen Titer von 1:512. Nach Impfung mit Novyi-Toxoid allein oder in Kombination mit Tetanus-Toxoid wurden keine postvazinalen Antitoxine gebildet; mit dem Dreifachimpfstoff Novyi-Tetanus- und Perfringens-Toxoid ließ sich aber

ein Antitoxintiter von 1:8 nachweisen. Bei *C. perfringens* konnten in keinem Fall Antitoxine festgestellt werden. Im Belastungsversuch dagegen wurde mit dem Einfach- und Zweifachimpfstoff ein Wirksamkeitsindex von 64 und mit dem Dreifachimpfstoff ein Wirksamkeitsindex von 80 erzielt.

Summary

The effectiveness of a monovalent vaccine against gas-gangrene and tetanus was examined in comparison with the use of a polyvalent vaccines in mice. Formalininactivated *C. tetani*-, *C. novyi*- and *C. perfringens*-toxins were used for the immunization separately or in combination. Proof of the effectiveness was done by the comparison of the death rate of vaccinated and non-vaccinated animals after toxin challenge and by the determination of antitoxins with indirect hemagglutination test (*C. tetani* and *C. novyi*) respectively neutralisation test (*C. perfringens*).

The results prove that mice can be immunized efficient and harmless with the used Clostridia-toxoids. Within the different toxoids there were no essential differences in efficacy between monovalent and bivalent vaccines, whereas the efficacy of vaccination with trivalent vaccines was more successful than with mono- or bivalent vaccines. In case of tetanus-toxoid we measured a postvaccinal antitoxin titer of 1:32 for monovalent vaccine and an antitoxin titer of 1:512 for trivalent vaccine. In case of novyi-toxoid we observed antitoxins post vaccination only after vaccination with trivalent vaccine. After vaccination against *C. perfringens* we could not detect antitoxins in any case. After toxin challenge we achieved an efficiency index of 64 with monovalent and bivalent vaccine and an index of 80 with trivalent vaccine.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- | | |
|--------------------------|--|
| Ajil, S.J. (1970) | Microbial toxins |
| Kadis, S. | A comprehensive treatise |
| Montie, Th.C. | Vol. I Bacterial protein
toxins.
Academic Press New York
and London |
| Aleksandrov, N.I. (1970) | Aerosol revaccination with |
| Gefen, N.E. | thyphoid-botulin A and B |
| Egorova, N.B. | trivaccine and thyphoid- |
| Efmerova, V.N. | tetanus-botulin A and B |
| Vorontsov, J.V. | tetra-vaccine using experi- |
| Mirošničenko, I.N. | mental animals.
Ž. Mikrobiol. Epidemiol.
Immunobiol. 47(5) 84-89 |
| Al-Khatib, G. (1968) | Über den Nachweis und die
Differenzierung von C.per-
fringens und seiner Toxine
im Darminhalt verendeter
Haustiere.
Mh. Vet.Med. 23,593-597 |
| Amtsberg, G. (1977) | Zum Vorkommen und zur pa- |
| Bisping, W. | thogenen Bedeutung von C. |
| Krapisch, P. | perfringens beim Kalb. |
| Mathiesen, I. | Zbl. Vet.Med. 24 B(2)
104-113 |
| Bagadi, H.O. (1974) | Infectious necrotic hepa-
titis (black disease) of
sheep.
Vet. Bull. 44 385 |

- Beer, J. (1968)
Al-Khatib, G.
Zum Nachweis und zur Differenzierung pathogener Clostridien und ihrer Toxine.
Mh. Vet.Med. 23, 709
- Beer, J. (1968)
Al-Khatib, G.
Pilz, H.
Enterotoxämie der Kälber durch *C. perfringens* Typ B.
Mh. Vet.Med. 23, 18-25
- Bittner, J. (1963)
Experimental prophylaxis of gas gangrene with monovalent and polyvalent toxoids.
Bull.Off. int.Epizoot. 59
1005-1016
- Brooks, M.E. (1957)
Sterne, M.
Warrack, G.H.
A re-assessment of the criteria used for the type differentiation of *C. perfringens*.
J. Path. Bact. 74, 185
- Cardella, M.A. (1960)
Duft, J.T.
Wingfield, B.H.
Gottfried, C.
Studies on immunity to toxins of *C. botulinum*
VI. Purification and detoxification of typ D toxin and the immunological response to toxoid.
J. Bact. 79, 372-378
- Choman, B.R. (1969)
Sequential growth of *C. chauvoei* *C. septicum* and *C. novyi* in the same medium.
Am. J. vet. Res. 30,133-137

- Clark, F.E. (1937) A comparative study of *Bacillus befermentans*, *Bacillus centrosperogenes* and certain closely related proteolytic anaerobies.
J. Bact. 33, 23
- Claus, V.D. (1964) A mineral oil adjuvant vaccine for bacillary haemoglobinuria.
A. J. vet. Res. 25, 699-703
- Dedić, K. (1957)
Scheibner, G.
Preuß, H. Zur Enterotoxämie der Schafe vom Typ C in Deutschland.
Arch. exp. Vet.Med. 11, 921
- Djurichovic, S.M. (1975)
Dworak, J.E.
Wickham, K. Antitoxintiter in colostrum and milk after vaccination of sows with *C. perfringens* type C toxoid vaccine.
Vet.Med. Animal Clin. 70, 3, 283-285
- Edgar, C. (1928) Some observations bearing upon the aethiologie of black disease.
Aust. vet. J. 5, 55
- Ellner, P.D. (1963)
Green, S.S. Serological grouping of the pathogenic clostridia.
J. Bact. 86, 1098-1100
- English, J.E. (1966) Fieldexperience with *C. enterotoxaemia* in young animals.
J.Amer.Vet.Ass. 149, 1565

- Gefen, N.E. (1975) Die Wirksamkeit der Gasödem-Toxoide bei Wiederimpfung mittels der Aerosol-Methode. Voennno-Med. Ž. 215(2) 47-48
- Egorova, N.B.
- Mirošničenko, J.N.
- Efmerova, V.N.
- Serdey, A.I.
- Ghoniem, N.A.M. (1972) Untersuchungen über das Vorkommen von Clostridien bei gesunden Schafen in Ägypten. Dt. Tierärztl. Wschr. 79 No 14, 351-353
- Abdel-Hafiz, Y.Z.
- Griesemer, R.A. (1962) Enterotoxaemie in beef, calves. 30 years observations J. Amer. Vet. Ass. 140, 154
- Krill, W.R.
- Grigoriu, N. (1966) Untersuchungen zur Verbesserung der Anaerobiöse-Impfstoffe für Schafe. Arch. Vet. (Buk.) An. I. Tom. I. Fasc. II. 108
- Petrovsky, M.
- Hardegree, M.C. (1971) Tetanolysin: in vivo effects in animals. J. inf. Dis. 123, 51-60
- Palmer, A.E.
- Duffin, N.
- Hauschild, A.H.W. (1965) Separation of C. perfringens type D-toxins. J. Immunol. 94, 551-554
- Helwig, D.M.
- Thomas, J.H.
- Williams, L.G.
- The bovine enterotoxemia complex. Its aetiology, antibody response to vaccination and problems in diagnosis. Aust. vet. J. 43, 364-367

- Hepple, J.R. (1960)
Jull, D.J. Simultaneous vaccination of sheep against pulpy kidney disease, braxy, blackleg and tetanus.
Vet. Rec. 72 766
- Jamagishi, T. (1964)
Ishida, S.
Nishida, S. Isolation of toxigenic strains of *C. perfringens* from soil.
J. Bact. 88, 646-652
- Jansen, B.C. (1967)
v. Heyningen, W.E. The prevention of enteroxaemia by vaccination.
Bull. Off. int. Epizoot. 67, 1539-1567
- Joubert, L. (1967)
Papageorgiou, C. Epizootologie et prophylaxie des infections anaerobes entogenes des animaux.
Bull. Off. int. Epiz. 67, 1361
- Katitsch, R.V. (1961) The pathogenesis of clostridial disease of sheep.
Bull. Off. int. Epiz. 56, 929-934
- Katsaras, K. (1973)
Hartwick, H. Studien über die immunogene Wirkung verschiedenartig präparierter Toxine des *C. welchii* (*perfringens*) Typ A ohne und mit inkompletten Freundschens Adjuvans bei Kaninchen und Schafen.
Zbl. Vet. Med. B 20, 547-557

- Katsaras, K. (1976)
Hartwick, H.
Nachweismethoden der Toxine
des *C. perfringens* unter be-
sonderer Berücksichtigung
des Enterotoxins.
Zbl. Bact. Hyg., I.Abt.Ref.
249, 97
- Kerry, J.B. (1969)
Thomson, A.
A note on the intraperitoneal
injection of sheep with oil
adjuvant vaccines.
Vet. Rec. 85, 84-85
- Klose, F. (1970)
Aktive und passive Schutz-
impfung gegen Wundstarrkrampf
und Clostr.-novyi-Gasödem.
Dt. med. Wschr. 95, 510-513
- Köhler, B. (1973)
Ständer, R.
Untersuchungen zum Vorkommen
von *C. perfringens* und seiner
Toxine und zur *C. perfringens*-
Enterotoxämie beim Rind.
Arch. für exp. Vet. 27 Heft 1
29-47
- Larina, I.A. (1966)
Die Prophylaxe von Anaerobier-
infektionen im Tierversuch an
Affen.
Žurn. mikrobiol. epidemiol i
immunobiol. Nr. 1 518
- Mayr, A. (1977)
Bibrack, B.
Mischinfektionen 2. Teil
Bekämpfung.
notabene medici 7, 25-31

- Mellanby, J. (1964) Specific precocious protective action of toxoids.
Nature, London 203, 312-313
- Möllby, R. (1976) Production phospholipase
Holme, T. C. (alphatoxin) haemolysins
Nord, C.E. and letal toxins by C. per-
Smyth, C.J. fringens types A to D.
Wadström, T. J. gen. Microbiol. 96 (1)
137-144
- Nedjalkov, S. (1973) Zur Wechselwirkung der Anti-
Stoilowa, N. gene in Mischvakzinen gegen
Pytschev, B. Anaerobierinfektionen der
Schafe.
Arch. exp. Vet.Med. 27, 185
- Nishida, S. (1964) Isolierung von toxischen
Nakagawara Stämmen von C. novyi aus
Erdfproben.
J. Bact. 88, 1636-1640
- Oakley, C.L. (1953) Routine typing of C. welchii.
Warrack, G.H. J. Hyg., 51 102
- Pierson, R.E. (1968) Immunization of feedlot
lambs with enterotoxemia
toxoid and bacterin.
J. Am. vet. med. Ass. 152
380-381

- Quesada, A. (1972)
Fenizia, D.
Damiano, N.
Activity of nonspecific gas
gangrene vaccines, AlOH and
prepared from highly toxic
strains.
Atti della Società Italiana
delle Scienze Veterinarie 26,
534-537
- Radvila, P. (1965)
Löhrer, J.
Passive and active immunity
to tetanus and its course.
Schw. Arch. Tierh. 107,
123-157
- Rafiyi, A. (1961)
Ardahali, M.
Disease of animals, caused
by *Clostridium welchii*.
Bull. Off. int. Epiz. 55, 972
- Rolle, M. (1978)
Mayr, A.
Mikrobiologie, Infektions-
und Seuchenlehre, 4. Auflage.
Ferdinand Enke Verlag,
Stuttgart
- Saxinger, G. (1951)
Heinig, A.
Experimentelle Untersuchun-
gen bei Pferden und Schafen
über Eintritt und Dauer der
Immunität nach einmaliger
Impfung mit Tetanus-toxin-
Aluminiumhydroxyd-Schutz-
impfstoff.
Mh. Vet. Med. 6, 434

- Schallehn, G. (1970) Pathogenicity of *C. novyi* strains and their reactions to antibiotics.
Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A 215, 348-359
- Schallehn, G. (1975) Zur Toxigenese von *Clostridium novyi* Typ A
1. Mitteilung: α -Toxin Bildung in vitro.
Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A 232, 91-99
- Schneider, J. (1971) Ulcerative enteritis in chicks.
Arch. Geflügelk. 35, 10-13
- Seftner, W. (1959) Wesen und Vorbeuge des Labmagen-Pararäusbrandes und der Enterotoxämie der Schafe.
Mh. Vet. Med. 14, 559
- Seifert, H.S.H. (1975) Untersuchungen zur Ätiologie von Anaerobierinfektionen bei Rindern und Schafen in Lateinamerika.
Zbl. Vet. Med. B. 22, 60-86
- Shinjo, J. (1965) Studies on the genus *Clostridium* I. Clostridial flora of the faeces and alimentary tracts of various animals.
Ogata, M.
Jap. J. vet. Sci. 27, 263-270

- Shulman-Satin, B.B.(1969) Vergleichende Immunmorphologie der Aerosol- und subkutanen Immunisierung durch Unterleibstyphus-Antigen in Verbindung mit Tetanus-Anatoxin (russ.).
Zh. Mikrobiol., Epidemiol., Immunobiol. 40, 18
- Sinhal, M. (1975) Untersuchungen über das Auftreten von *C. perfringens* bei Haustieren (Pferde, Rinder, Schweine, Hunde, Katzen, Hühner).
W. Tierärztl. Mschr. 62, Heft 5 163-169
- Smyth, C.J. (1972) Purification, properties and biological characteristics of *C. perfringens* typ A theta-toxin.
J. gen. Microbiol. 73, xxvi
- Stamp, J.T. (1963) Importance of Anaerobes in the Causation of Animal Disease.
Bull. Off. int. Epiz. 59, 1271
- Thomson, R.O. (1969) The immunogenicity of a multi-component clostridial oil emulsion vaccine in sheep.
Vet. Rec. 85, 81-84
- Batty, I.
Epps, H.B.
Forster, W.H.

- Thompson, A. (1953) The Antigenic Efficiency of
Bathy, L. Pulpy Kidney Disease Vaccines.
Vet. Res. 65 659-663
- Trüdinger, C. (1977) Untersuchungen über eine he-
terospezifische Immunisie-
rung zwischen *C. tetani* und
C. novyi.
Vet.Med. Diss., München
- Vlasova, E.V. (1969) Immunisierung gegen Gasödem-
Larina, I.A. erkrankung und Tetanus mit
Sextatoxoid.
Žurn. mikrobiol. epidemiol i
immunobiol. Nr.7 113-116
- Warrack, G.H. (1963) Some observations on the
typing of *C. perfringens*.
Bull. Off. int. Epizoot. 59,
1393-1400
- Wigley, F.M. (1969) Aerosol Immunization of
Wood, S.H. Humans with Tetanus Toxoid.
Waldmann, R.H. J. Immunol 103, 1096-1098
- Williams, B.M. (1976) Infectious necrotic hepatitis
of sheep: an epidemiological
survey on welsh farms.
Brit. Vet. J. 132 (2) 221-225
- Zeissler, (1943) Ein neuer Bazillus im Darm-
Rassfeld-Sternberg, L. inhalt von Kranken mit Enteri-
tis necroticans.
Zbl. Bact. Hyg. I Abt. Orig.A
153, 304

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof.
Dr. DDr. h. c. Anton Mayr vielmals dan-
ken für die Überlassung des Themas.

Mein spezieller Dank gehört Herrn Dr.
Georg Baljer für die wertvollen Hin-
weise und seine stete Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Ich bin am 20. Juli 1952 in Augsburg geboren. Die Grundschule besuchte ich in den ersten zwei Jahren in Stätzling, die folgenden zwei Schuljahre in Algasing.

Von 1962-71 war ich Schüler des Maristenkollegs in Mindelheim und bestand dort das Abitur. Anschließend leistete ich meinen Wehrdienst ab bei der Luftwaffe in Lager Lechfeld.

Im Wintersemester 1972/73 begann ich an der Universität München mit dem Studium der Tiermedizin, das ich 1978 mit dem Staatsexamen beendete.

Seit 17. August 1973 bin ich mit der Volksschullehrerin Gabriele Piendl, geborene Reisch, verheiratet.

